台灣產抗氧化生藥之資源開發研究

林俊清　顏銘宏

摘　要

本研究進行數種台灣產生藥之抗脂質過氧化及清除自由基能力之活性評估。抗脂質過氧化之實驗以 $FeCl_2$-Ascorbic acid 誘發脂質過氧化，再用 TBA 法測其 Malondialdehyde (MDA) 之含量，以評估抗脂質過氧化之能力。清除自由基能力之實驗首先以 Cytochrome c 還原比色法初步評估生藥清除超氧自由基（・O_2^-）之能力，最後採用 Hypoxanthine-Xanthine Oxidase (HPX/XOD) 和 Fenton 反應體系分別產生 Superoxide radical (Superoxide Anion Radical ；・O_2^-) 及 Hydroxyl radical (・ OH) ，以 5,5-Dimethylpyrroline-N-oxide (DMPO) 作爲 Spin aduct 捕捉劑，並以電子自旋共振 (ESR) 技術直接且精確的觀察生藥對氧自由基的清除作用。實驗結果顯示欖仁葉、苧麻根、山（青）苧麻根、兩種白花蛇舌草（繖花龍吐珠、水線草）、粟米草等數種台灣產生藥具有不同程度的抗氧化、清除自由基的活性。

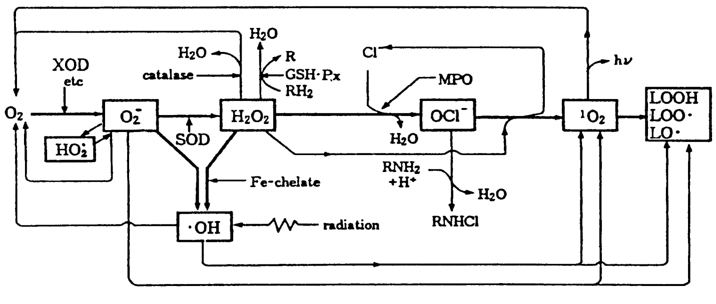
關鍵字：抗氧化物質、民間生藥

高雄醫學院藥學系暨天然藥物研究所教授、副教授

前　言

脂質過氧化與自由基之產生是互有關聯的兩件事。脂質過氧化被證實是造成人類老化、老年癡呆症、心血管疾病、糖尿病……等大部份文明病的主要致病因子之一，而自由基則是造成脂質過氧化的元兇。自從 Harman 在 1956 年最先提出自由基學說以來，近二十年間專家學者已迅速的展開研究人體內過剩的自由基所引起臨床疾患，並積極開發具有抗脂質過氧化與清除自由基能力的物質，以增進人類的健康。

自由基被定義爲具有不配對電子或含奇數個電子的物質的總稱，親和力極強，會攻擊核酸、蛋白質、氨基酸、脂質、脂蛋白…等，造成體內不飽和脂肪酸氧化形成過氧化脂質 (Lipid peroxidation ，簡稱 LPO) 、蛋白變性、酵素被抑制、氨基酸架構改變、代謝異常、 DNA 鎖被切斷、細胞變異及生物活性因子不活化等障害，而對機體造成嚴重損傷[1-8]。人體在新陳代謝過程中，受外在環境 (物理、化學) 和內在環境 (生理、病理) 的影響，常產生自由基，尤其在線粒體和微粒體部位消耗氧分子最集中的細胞器，當氧分子自代謝物接受電子轉移的過程中，會產生氧的代謝產物，如超氧陰離子自由基 (Superoxide anion radical ；・ O_2^-) 、羥自由基 (Hydroxyl radical ；・ OH) 和過氧化物等。另外在肝臟內質網上的藥物代謝系統 Cytochrome p-450 會將許多化學物質或藥物代謝成毒性極強的自由基而造成人體器官的傷害，例如四氯化碳被代謝成活性極強的 Trichloromethyl radical(・ CCl_3) 或 Trichloromethyl peroxy radical (・ CCl_3O_2)[9-10]；台灣民衆最常使用的解熱鎭痛劑 Acetaminophen 被氧化成中間代謝物 N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI)[11-13] 等等均是活性極強的自由基。

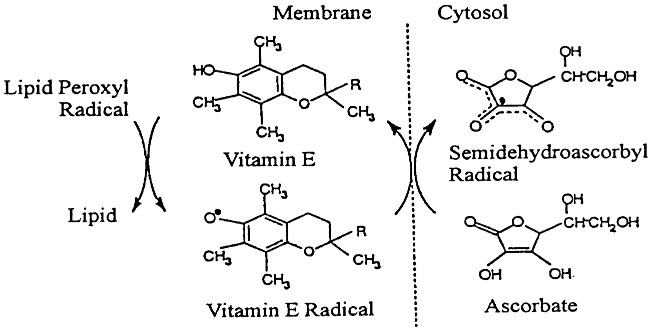


活性氧自由基的代謝(摘自大柳善彥：SOD及活性酸素調節劑)

XOD： xanthine oxidase	SOD： superoxide dismutase
R： organism	MPO： myeloperoxidase
LOO・ ： peroxy radical	LOOH： lipid peroxidation (LPO)
LO・ ： alkoxy radical	hν： light

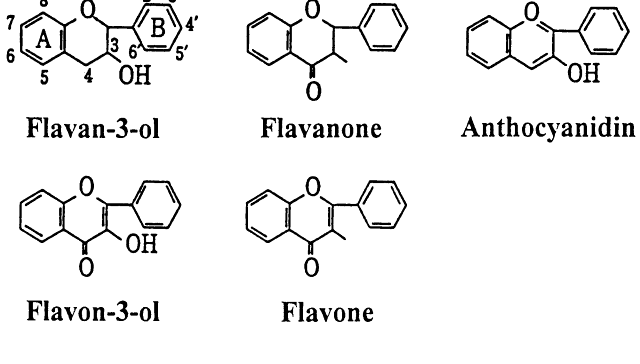
人體內具有許多的酵素可清除某些特定的自由基，如上圖所示， Superoxide dismutase (SOD) 可將・ O_2^-代謝成 H_2O_2 ； Catalase 可將 H_2O_2 代謝成 H_2O ； Glutathione 除可將 H_2O_2 代謝成 H_2O 外，亦能補捉 NAPQI ，形成 Mercapturic acid 而排出體外 (14-15) 。許多疾病如 Morrison 肝癌、糖尿病、 SLE 、類風濕性關節炎、老化、愛滋海默症等 (16) 病人體內 SOD 的含量都遠低於正常人。

除酵素外， Vit-C 及 Vit-E 也具有抗氧化、清除自由基的作用，尤其 Vit-C 除本身能將・ OH 代謝成 H_2O_2 外，亦可將氧化型的 Vit-E 還原（如右圖所示）。



Interaction between Vit-C and Vit-E

至於由植物所取得的天然物如 Flavonoids 、 Tannin 、 carotene等等也顯示具有不錯的抗氧化、清除自由基的活性。許多研究資料顯示 (17-18) ，補充抗氧化物質和自由基清除劑(Free radical scavenger)可以緩解疾病、抗衰老等之作用。基於這些發現，尋找可以消除或抑制活性氧及抗脂質過氧化之藥物，乃刻不容緩之事，同時也是當今醫學領域中一個重要之課題。本研究將報告欖仁葉、苧麻根、山（青）苧麻根、兩種白花蛇舌草（水線草、繖花龍吐珠）、粟米草等數種台灣產生藥的抗氧化、清除自由基的活性。

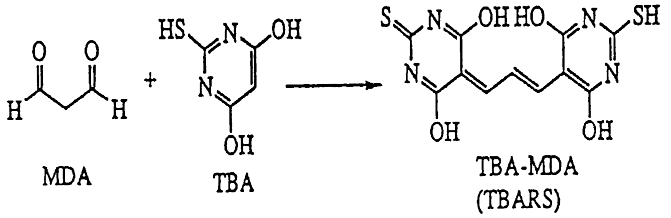


◎具清除・OH能力的Flavonoids

分析方法、結果與討論

◎$FeCl_2$-Ascorbic acid所誘發脂質過氧化之測定(19-30)

實驗原理係利用脂質過氧化的終產物之一的丙二醛（Malondialdehyde; MDA）能與 TBA（Thiobarbituric acid）反應，生成紅色產物，其顏色越深表示 MDA 量越多，而 MDA-TBA 生成物在532nm波長有最大吸收度。



Reaction of malonaldehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA)

①大白鼠肝臟 homogenate 之製備

將大白鼠斷頭後，迅速解剖採取肝臟，取 2 公克肝臟，加入 10ml 150 mM 之 KCl-Tris-HCl 緩衝液（pH=7.2），用均質機研碎，500 g 離心 10 分鐘，取上清液。

② TBA-RS（Thiobarbituric acid-reactive substances）之測定

取 0.5ml 之 Liver homogenate 加入 0.1ml Tris-HCl 緩衝液（pH=7.2）、0.2ml 6mM Ascorbic acid、0.1ml 4mM 氯化亞鐵及 0.1ml 各種濃度生藥抽出物，於37℃下 incubate 一小時後，加入 0.5ml 0.1N HCl、0.5ml 1.74%SDS 及 0.5ml 精製水，強力振盪均勻後加入 2ml 0.5%TBA。混合後在熱水浴（95 ℃）中加熱30分鐘，待冷卻後加入 5ml n-BuOH。強力振盪混合均勻後，1000g 離心10分鐘，取 n-BuOH 層，在 532nm 下測其吸光度（Shimadzu UV-2000 UV-VIS spectrophotometer）。

$$\text{抑制率 (Inhibition rate; I\%)} = \frac{\text{Me-Mt}}{\text{Me-Mc}} \times 100\%$$

Mc ＝控制組的 MDA 值；Me ＝實驗組的 MDA 值；Mt ＝生藥組或對照藥物組的 MDA 值。結果如下：

The inhibitory effects of aqueous extracts of *B. nivea* var. *nivea* (BNN) and *B. nivea* var. *tenacissima* (BNT) on FeC12-Ascorbicacid induce lipid peroxidation in a rat liver homogenate in vitro.

Groups	Concentration (mg/ml)	MDA (nmole/mg protein)	Inhibition (%)
Normal	-	1.35±0.07	-
$FeCl_2$-AA	-	2.31±0.08**	-
$FeCl_2$-AA+BNN(苧麻)	1	2.15±0.07	16.7
	3	2.11±0.06	20.8
	10	1.58±0.03*	76.0
$FeCl_2$-AA+BNT(山苧麻)	1	2.15±0.01	16.7
	3	2.00±0.12	32.3
	10	1.67±0.05*	66.7

Values represent the meanS.E. (n=5).
*p<0.05; **p<0.01 (Student's t-test), significantly different from normal control group.

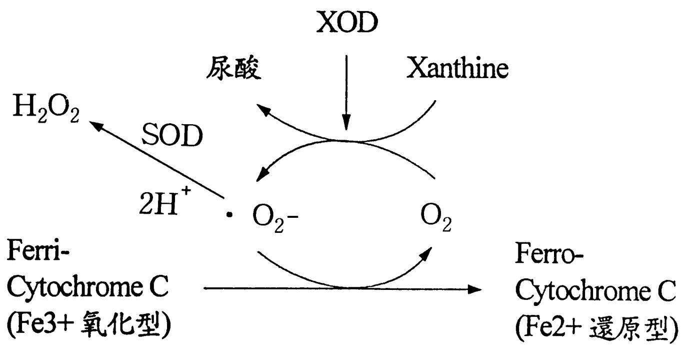
The inhibitory effect of aqueous extract of *Terminalia catappa* (TCP) on $FeCl_2$-Ascorbic acid induce lipid peroxidation in a rat liver homogenate in vitro.

Groups	Concentration (mg/ml)	MDA (n mole/mg protein)	Inhibition (%)
Normal	—	0.55±0.26	—
$FeCl_2$-AA	—	1.91±0.44*	—
$FeCl_2$-AA+TCP(欖仁葉)	1	1.59±0.51a)	23.13
$FeCl_2$-AA+TCP	3	1.28±0.38a)	46.27
$FeCl_2$-AA+TCP	10	0.58±0.34a)	99.50

Values represent the meanS.E. (n=6).
* p<0.01 (Student's t-test), significantly different from normal control group.
a)p<0.01 (Student's t-test), significantly different from $FeCl_2$-AA control group.

◎Cytochrome c還原比色法清除超氧陰離子自由基活行評估

本實驗參考 McCord 與 Fridovich 之方法[31]，為初步評估藥物抗氧化清除自由基活性之首選方法，原理為利用 Xanthine oxidase 催化 Xanthine 變成 Uric acid，同時產生 Superoxide ($\cdot O_2-$)，再利用 Cytochrome c 與・O_2-之間之氧化還原反應，造成還原型 Cytochrome c 增加，於 550 nm 波長下有特異吸收，測吸光度的增減即可推算出清除・O_2-的能力。



Cytochrome C法測・O_2-含量(McCord & Fridovich法)

實驗方法首先配製“ E 液”，包含有 KH_2PO_4 (50mM) 2ml, Xanthine (0.1mM) 40ml, EDTA (0.1mM) 2ml, Cytochrome c (0.1mM) 2ml 。控制組於 Cell 中加入 E 液 400μl，水 580μl，混合均勻，放好 Cell 先歸零，再加入 Xanthine oxidase 20μl，迅速攪拌，於 550 nm 下測吸光度 (Ac) 。生藥組於 Cell 中加入 E 液 400μl，水 530μl，生藥抽出液 50μl，混合均勻，放好 Cell 先歸零，再加入 Xanthine oxidase 20μl，迅速攪拌，於 550 nm 下測吸光度 (At) 。

$$\text{抑制率 (Inhibition rate; I\%)} = \frac{Ac-At}{Ac} \times 100\%$$

實驗結果初步證實苧麻及山苧麻根部水抽出物 0.5 、1 、 3mg/ml 皆呈現抑制 superoxide radical 作用，其抑制率分別為苧麻 48.39 、 61.29 、 67.75% ；青苧麻 54.84 、 67.75 、 74.19% 。

由於此法只能藉由 cytochrome c 與・O_2^-之間的氧化還原作用間接求出・O_2^-含量，然而，因生藥抽出物含有許多複雜且不穩定之化合物，一旦其能干擾 cytochrome c 之氧化還原作用時，便不適此實驗之判定。再則，具有 xanthine oxidase inhibition 活性之藥物，將造成偽陽性反應，亦不適此實驗之判定。所以本實驗之結果只能初步證實待檢生藥是否具有抑制 superoxide radical 作用，至於其精確清除能力則以能直接測定 free radical 之電子自旋共振技術 (electron spin resonance ， ESR) 來評估。但基於成本及時間等便利性的考量，本實驗仍不失為一初步評估藥物抗氧化活性之首選方法。

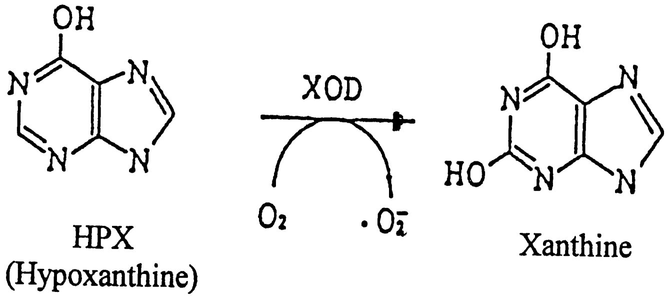
◎電子自旋共振技術來評估自由基的清除作用(32- 37)

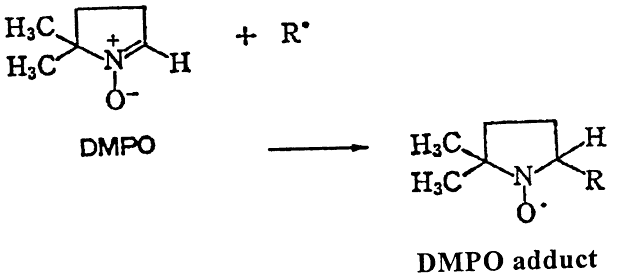
◎測試樣品之製備

所有測試物質 (各種生藥之抽出物或 SOD) 於測試前，先行用 0.1M PBS (Sodium Phosphate Buffer Solution) (pH=7.8)及純水在室溫下調配妥當。

◎Superoxide Radical(• O_2^-)之測定

如右圖所示，實驗之原理係利用 Hypoxanthine-xanthine oxidase 反應體系來產生 Superoxide 自由基，以 DMPO (5,5-dimethyl-pyrroline-N-oxide) 來捕捉超氧自由基，使形成 spin adduct (DMPO-OOH)(如下圖所示)，然後再用 ESR spectrometer (JEOL-JES-FR80 ，JEOL Ltd.,Tokyo) 來分析。





其操作步驟如下：取 50μl 2mM hypoxanthine(HPX) 、 35μl 5.5mM Diethylenetriamine pentaacetic acid (DETAPAC) 、 50μl 各種不同濃度之 SOD 或各種生藥抽出物及 15μl 的 DMPO ，置於試管中，混合均勻，再加入 50μl 的 Xanthine oxidase (XOD) ，加以攪拌混合後，移至 ESR 之測定石英 cell 中。於加入 XOD 後 40 秒，開始用 ESR spectrometer 來測定。測定條件為： magnetic field: 334.7 ± 5.0mT ； microwave power: 8.0mW (9.416GHz) ； sweep time: 2 分鐘； modulation frequency: 100KHz ； modulation amplitude: 0.79 × 0.1mT ； receiver gain: 2 × 100 ；溫度：37 ℃； response time: 0.1s 。

爲求得DMPO-OOH或 DMPO-OH 訊號（signal）之相對應強度，採用 Kohdo 等人[37] 所使用的方法，以 Mn^{2+}(MnO) 作內部標準品（internal standard signal），並計算出DMPO-OOH或 DMPO-OH 之訊號強度對 Mn^{2+} 之相對訊號強度比值，作爲・O_2- 或・OH 含量的指標。結果如下：

ESR signal activity of Mn^{2+} and $\cdot O_2^-$ in various concentrations of SOD.

SOD (Unit/ml)	ESR Signal Mn^{2+}	Peak Height Radical	Averaged Relative Peak Height
0.0000	85.400	247.000	2.892
1.6320	84.800	180.200	2.125
4.0800	86.000	134.400	1.563
8.1600	84.200	86.800	1.031
12.2400	85.600	65.600	0.766
16.3200	87.800	52.400	0.597

Regression Coefficient I0/I-1=0.237598×SOD - 0.088816
Correlation Coefficient 0.999248
I indicates the relative peak height when various concentrations of SOD were added.

利用 ESR spin trapping 法，可由 spin adduct 之spectrum強度求出・O_2- 產生量。例如爲測定所偵測物質之 scavenger 活性，可利用如 SOD 和 DMPO 競爭與・O_2- 反應之方法，首先求出由hypoxanthine與 xanthine oxidase 反應所產生之・O_2- 量，然後對所添加不同濃度 SOD 之消除・O_2- 強度作成檢量線，再將偵測物質放入同一反應體系，觀測其對・O_2- 之消除活性（superoxide scavenger activity），再與檢量線相對照，便可求出各種生藥內之 superoxide scavenger 活性，或稱爲SOD-like activity。結果如下：

SOD-like (superoxide radical scavenger) activity assay to *Hedyotis corymbosa* (HC)、*H. diffusa* (HD)、*Mollugo pentaphylla* (MP)、*Terminalia catappa* (TCP)、*Boehmeria nivea* var. *nivea* (BNN) and *B. nivea* var. *tenacissima* (BNT).

Sample	Conc.	Signal Peak Heigh		[a] SOD-like Activity	IC_{50}
	(g//ml)	Mn^{2+}	Radical	(Unit/g)	(mg//ml)
–	–	92.00	236.60	–	–
HC(繖花龍吐珠)	2.06×10^{-3}	92.20	83.00	5.00×10^{3}	1.10
HD(水線草)	2.06×10^{-3}	89.00	83.40	4.72×10^{3}	1.17
MP(粟米草)	5.17×10^{-3}	90.00	92.80	1.60×10^{3}	3.43
TCP(欖仁葉)*	4.00×10^{-5}	85.00	73.40	2.57×10^{5}	0.018
BNN(苧麻)*	1.25×10^{-4}	84.80	77.60	1.50×10^{4}	0.61
BNT(山苧麻)*	1.00×10^{-3}	85.80	84.60	1.70×10^{4}	0.54

a Calibration curve:Y= 0.178206 X + 0.021192; Where Y= $[I_0/I - 1]$, X=[SOD (unit/ml)].

I_0 : 2.572 (without SOD or crude drug).

* Calibration curve:Y= 0.237598 X − 0.088816; I0 : 2.892.

I indicates the averaged relative peak height [Radical/Mn^{2+}] in various concentration of crude drug.

◎Hydroxyl Radical (・OH) 之測定

以 Fenton 反應體系來產生 Hydroxyl 自由基，以 DMPO (5,5-dimethyl-pyrroline-N-oxide) 來捕捉羥自由基，使形成 spin adduct (DMPO-OH)，然後再用 ESR spectrometer (JEOL-JES-FR80 ， JEOL Ltd., Tokyo) 來分析。

操作步驟如下：取 37.5μl 1mM 硫酸亞鐵 ($FeSO_4$ ・ $7H_2O$)、37.5μl 5.5mM Diethylenetriamine pentaacetic acid (DETAPAC)、50μl 各種不同濃度之維他命 C 或各種生藥抽出物及 20μl 的 DMPO ，置於試管中，混合均勻，再加入 75μl 的 1mM 的 H_2O_2 ，加以攪拌混合後，移 ESR 之測定石英 cell 中。於加入 H_2O_2 後 40 秒，開始用 ESR spectrometer 來測定。測定條件為： magnetic field: 335.4 ± 5.0mT ； microwave power: 8.0mW (9.416GHz) ； sweep time: 2 分鐘； modulation

frequency: 100KHz ； modulation amplitude: 0.79 × 0.1mT ； receiver gain: 1 × 100 ；溫度：37 ℃； response time: 0.1s 。結果如下：

Hydroxyl radical scavenger activity assay to *Hedyotis corymbosa* (HC)、*H. diffusa* (HD)、and *Mollugo pentaphylla* (MP).

Sample	Conc. (g//ml)	Signal Peak Heigh		a) Hydroxyl Radical Scavenger Activity (%)	IC_{50} (mg//ml)
		Mn^{2+}	Radical		
–	–	49.80	594.80	–	–
HC	1.02×10^{-2}	48.00	266.20	49.0	9.57
HD	1.02×10^{-2}	47.80	316.00	42.0	11.13
MP	7.60×10^{-3}	48.60	267.00	74.0	6.34

a) Reaction system:1 mM $FeSO_4$ 37.5μl, 5.5 mM DETAPAC 37.5μl, 0.092M DMPO 20μl, 1 mM H_2O_2 75μl、and test solution 50μl . One unit means the hydroxyl radical scavenger activity by 1 mM asccorbic acid in this reaction system.

結　論

(1)以 $FeCl_2$-ascorbic acid 誘發體外非酵素性脂質過氧化及 TBA 法，評估生藥之抗氧化活性，結果顯示各生藥水抽出物抑制脂質過氧化之有效濃度分別為：苧麻及山苧麻根部10mg/ml；欖仁葉 1 、 3 、 10 mg/ml 。

(2)以電子自旋共振技術 (electron spin resonance ， ESR) 與電子捕捉技術 (spin-trapping) 來評估生藥清除自由基之活性，實驗結果證實清除・O_2^- 活性 (SOD-like activity) 及IC_{50}分別為苧麻根 (*Boehmeria nivea* var. *nivea*) ： 1.50 × 10^4 unit/g ， 0.61mg/ml ；山苧麻根 (*B. nivea* var. *tenacissima*) ：1.70 × 10^4unit/g ， 0.54mg/ml ；欖仁葉 (*Terminalia catappa*) ： 2.57 × 10^5unit/g ， 0.018mg /ml ；繖花龍吐珠 (*Hedyotis corymbosa*) ： 5.00 × 10^3unit/g ， 1.10mg/ml ；水線草 (*H. diffusa*) ： 4.72 × 10^3unit/g ， 1.17mg/ml ；粟米草(*Mollugo pentaphylla*) ： 1.60 × 10^3unit/g ， 3.43mg/ml 。清除・OH 能力百分比分別為：繖花龍吐珠(49%)；水線草(42%)；粟米草(74%)；IC_{50}分別為：繖花龍吐珠

(9.57 mg/ml)；水線草 (11.13 mg/ml)；粟米草 (6.34 mg/ml)。

致 謝

感謝中山大學生物系楊遠波教授鑑定植物之基源；感謝嘉南藥理學院楊政哲副教授、羅彩瑄、陳雅玲藥學碩士、許芬芳研究助理完成各項之活性研究。

引用文獻

1. Slater TF., Free-radical mechanism in tissue injury (Review), 222, 1-15, 1984.
2. Sevanian A. and Hochstein P., Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological systems.(Review), Ann. Rev. Nutr., 5, 365-390, 1985.
3. Nagata, C., M. Kodama, Y. Loki and T. Kimura, Free radicals produced from chemical carinogens and their significance in carcinogenesis. In Free Radicals and Cancer. (Ed. by Floyd, R.A.), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pp. 1-62, 1982.
4. Di Rosa, M. and L. Sorrentino, The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan., Eur. J. Pharmacol., 4, 340-342, 1968.
5. Christie, G. and J. Judah, Mechanism of action of CCl4 on liver cells., Proc. R. Soc. Lond. ser., 142(B), 241-257, 1954.
6. Clawson G.A., Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity., Pathol. Immunopathol. Res., 8, 104-112, 1989.
7. Recknagel, R.O., Carbon tetrachloride hepatotoxicity., Pharmacol. Rev., 19(2), 145-208, 1967.
8. Packer, J., T. Slater and R. Willson, Reactions of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical (CCl3O2) with amino acids: Pulse radiolysis evidence., Life Sci., 23, 2617-2520, 1978.
9. Richard, O.R. (1967) Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev. 19, 145-208.
10. Ferreyra, E.C., Fenos, O.M., Castro, J.A., Bernacchi, A.S. and Castro, C.R. (1977) Treatment of carbon tetrachloride-induced liver necrosis with chemical compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 42, 513-521.
11. Hyman, J.Z. and Willis, C.M. (1993) Disease of the Liver. 7th Edition, J.B.

Lippincott Co., Philadelphia. pp. 707-769.

12. Jie, L., Yaping, L., Chirukury, M. and Curtis, D. (1993) Protective effects of dleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. J. Pharma. Exp. Therap. 266, 1607-1613.

13. Moore, M., Thor, H., Moore, G., Nelson, S., Moldeus, P. and Orenius, S. (1985) The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-P-benzo-quinone imine in isolated hepatocytes is associated with thio depletion and increased cytosolic Ca2 +. J. Biol. Chem. 260, 13035-13040.

14. Nakano M., K. Asada and Y. Oyanagui Active Oxygen — Molecular Mechanism of its Production, Scavenging and Effect in Organisms. 共立出版株式會社 , Japan, 1990.

15. Oyanagui Y., SOD and Active Oxygen Modulators Pharmacology and Clinical Trials., Nihon-Igakukan Inc., Japan, 1989.

16. Oyanagui, Y. (1989) SOD and Active Oxygen Modulators. Pharmacology and Clinical Trials. Nihon-Igakukan Pub. Inc., Tokyo, pp 129-162.

17. Oyanagui Y., SOD and Active Oxygen Modulators Pharmacology and Clinical Trials., Nihon-Igakukan Inc., Japan, pp.129-163, 1989.

18. Oyanagui Y., SOD and Active Oxygen Modulators Pharmacology and Clinical Trials., Nihon-Igakukan Inc., Japan, pp.225-278, 1989.

19. Yagi, K. Lipid peroxidation and human diseases. Chem. Phys. Lipids, 45, 337-351, 1987.

20. Yoden, K., Iio, T., and Tabata, T. Measurement of thiobarbituric acid value in tissue homogenate solubilized with sodium dodecylsupphate. Yakugaku Zasshi, 100, 553-559, 1980.

21. Kimuya, K., Kubo, M., Tani, T.,Arichi, S., and Okuda, H. Studies on Scutellariae Radix. Ⅳ . Effects on lipid peroxidation in rat liver. Chem. Pharm. Bull., 29. 2610-2617, 1981.

22. Lowry, O., Rosegrough, N., Farr, A., and Randall, R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent., J. Biol. Chem., 193,265-275, 1951.

23. Helmut Sies Oxidative Stress, Academic Press INC. LTD.,London, pp.291-298, 1985

24. Yoshihiko Oyanagui Sod and Active Oxygen Modulators-Oharmacology and Clinical Trials., Nihon-Igakukan Inc.,Japan, pp.778-783, 1989.

25. Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepien, A., Kadziolka, A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clin. Chim. Acta., 155, 275-284, 1986.
26. Tsuchida, M., Miura, T., Mizutani, K., and Aibara, K. Fluorescent substances in mouse and human sera as p parameter of in vivo lipid peroxidation. Biochim. Biophys. Acta., 834, 196-204, 1985.
27. Kirkpatrick, DT, Guth, DJ, Mavis, RD. Detection of in vivo lipid peroxidation using the thiobarbituric acid assay for lipid hydroperoxides. J. Biochem. Toxicol., 1, 93-104, 1986.
28. Mihara, M., Uchiyama, M., Fukuzawa, K. Thiobarbituric acid value of fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxiation in aging, CCl4 intoxication, and vitamine E deficiency. Biochem. Med.. 23, 302-311, 1980.
29. Gutteridge, JMC. The use of standards for malonyldialdehyde. Anal. Biochem., 69, 518-526, 1975.
30. Nair, V., Turner, GA. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation. Structure of the adduct with malondialdedyde. Lipids, 19, 804-805, 1984.
31. McCord, J.M. and Frodovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erhtyro cuprein (hemocuprein). J.B.C. 244 (2), 6049-6055.
32. Mitsuta, K., Y. mizuta, M. Kohno, M. Hiramatsu and A. Mori. The application of ESR Spin-Trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. Bull. Chem. Soc. Jpn. 63,187-191, 1990.
33. Kohno, M., M. Yamada, K. Mitsuta, Y. Mizuta and T. Yoshikawa. Spin-Trapping studies on the reactionof Iron complexes with peroxides and the effect of water-soluble antioxidants. Bull. Chem. Soc. Jpn. 64,1447-1452, 1991.
34. Tsuda, T. et al., Radical scavenger effect of Boschniakia rossica. J. Ethnopharmacol. 141, 85-90, 1994.
35. Cadogan, J.I.G. Principles of Free Radical Chemistry, Chemical Society, London. pp.99-105, 1973.
36. Tanigawa, T. The determination of hydroxyl radical scavenging activity by electron spin resonance. J. Kyoto Pref. Univ. Med., 99, 133-143, 1990.
37. Oyanagui Y., SOD and Active Oxygen Modulators Pharmacology and Clinical Trials., Nihon-Igakukan Inc., Japan, pp.37-49, 1989.